DiaMetra

CE

ESTRIOL SALIVA

pour analyses de routine

Détermination immunoenzymatique directe d'œstriol dans la salive

IVD | **LOT** Voir l'étiquette externe | 2°C – 8°C | Σ = 96 tests | **RÉF DKO026**

USAGE PRÉVU

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative d'œstriol dans la salive.
Le kit Estriol Saliva est destiné exclusivement à un usage en laboratoire.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

L'œstriol est l'un des trois œstrogènes principaux produits par le corps humain. Il est produit avant tout pendant la grossesse à partir s'une unité materno-placento-fœtale.
La production fœto-placentaire d'œstriol entraîne une augmentation progressive des niveaux circulants maternels atteignant un pic en fin de gestation, considérablement supérieurs aux niveaux des femmes non enceintes. Dans la circulation maternelle, l'œstriol est rapidement conjugué dans le foie et excrété par voie urinaire avec une demi-vie de 20 minutes environ. Puisque la production normale de l'œstriol dépend d'une circulation materno-placento-fœtale intacte et d'un métabolisme fœtal fonctionnel, les taux maternels d'œstriol servent à contrôler l'état du fœtus pendant la grossesse, en particulier pendant le troisième trimestre.
La DHEA-S produite par le cortex de la surrénale du fœtus est converti en œstriol par le placenta.
Les niveaux anormalement bas peuvent indiquer, chez une femme enceinte, un problème dans le développement de l'enfant.
Les taux d'œstriol sont comparables chez les femmes non enceintes ou en ménopause et chez les hommes.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

L'œstriol (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec l'antigène marqué à la peroxydase par rapport à l'anticorps anti-œstriol adsorbé sur microplaque (phase solide).
Après une période donnée d'incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. L'enzyme présent dans la réaction liée catalyse la réaction entre le substrat (H_2O_2) et le substrat TMB (TMB) en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H_2SO_4).
L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration d'œstriol dans l'échantillon.
La concentration d'œstriol dans l'échantillon est calculée sur la base d'une série de Étalons.

3. REACTIFS, MATERIAUX ET INSTRUMENTS

3.1. Réactifs et matériaux fournis dans le coffret

1. Étalons d'œstriol (6 flacons, 1 mL chaque)

STD0	**RÉF DCE002/2606-0**
STD1	**RÉF DCE002/2607-0**
STD2	**RÉF DCE002/2608-0**
STD3	**RÉF DCE002/2609-0**
STD4	**RÉF DCE002/2610-0**
STD5	**RÉF DCE002/2611-0**

2. Contrôles (2 flacons, 1 mL chaque)

Contrôle L	**RÉF DCE045/2601-0**
Contrôle M	**RÉF DCE045/2602-0**

3. Tampon d'incubation (1 flacon, 30 mL)
Tampon phosphate pH 7,5; BSA 1 g/L; agents de conservation **RÉF DCE010-0**

4. Conjugué (1 flacon, 1 mL)
Conjugué d'œstriol avec peroxydase de raifort (HRP)
RÉF DCE002/2602-0

5. Microplaque coatée (1 microplaque sécable)
Anticorps anti-œstriol adsorbée sur microplaque
RÉF DCE002/2603-0

6. Solution de lavage conc. 50X (1 flacon, 20 mL)
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **RÉF DCE006-0**

7. Substrat TMB (1 flacon, 15 mL)
H_2O_2-TMB (0,26 g/L) *(éviter tout contact avec la peau)*
RÉF DCE004-0

8. Solution d'arrêt (1 flacon, 15 mL)
Acide sulfurique 0,15M *(éviter le contact avec la peau)*
RÉF DCE005-0

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le coffret

Eau distillée.

3.3. Matériaux et instruments auxiliaires

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

Dispositif de prélèvement de salive

	RÉF DKO063
Salivette Sarstedt	**RÉF 51.1534.500**

Remarques

Conserver tous les réactifs à 2÷8°C, à l'abri de la lumière.

N'ouvrir le sachet du Réactif 5 (Microplaque Coatée) qu'après l'avoir ramené à température ambiante et refermez-le tout de suite après avoir prélevé les bandes à utiliser; une fois ouvert, il est stable jusqu'à la date d'échéance du coffret.

Éviter de détacher la feuille adhésive des bandes qui ne sont pas utilisées pendant l'analyse en cours.

4. AVERTISSEMENTS

- Ce coffret est exclusivement pour usage in vitro et l'essai doit être exécuté par un personnel expert.
- Utilisez les dispositifs de protection individuelle prévus pendant toute opération avec les réactifs fournis.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300^{R} comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le Chromogène TMB contient un irritant qui peut être nocif si inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Pour empêcher des lésions, éviter toute inhalation ou ingestion par la peau ou les yeux et tout contact cutané ou oculaire.
- La solution d'arrêt est constituée d'une solution d'acide sulfurique dilué. L'acide sulfurique est poison et corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Pour prévenir toute brûlure chimique possible, éviter le contact avec la peau et les yeux.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H_2O_2 à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations d'œstriol de 2,5 à 4000 pg/mL.
- L'administration de stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer les taux salivaires d'œstriol.

5. PRÉCAUTIONS D'USAGE

- Observer rigoureusement l'ordre des passages indiqué dans le présent protocole.
- Tous les réactifs doivent être conservés à une température contrôlée de 2-8°C dans leurs conteneurs originaux. Les exceptions sont clairement marqués.
- Avant usage, laisser reposer tous les éléments des coffrets et les échantillons à température ambiante (22-28°C) et mélanger avec soin.
- Ne pas échanger des éléments du coffret provenant de lots différents. Les dates d'échéance rapportées sur les étiquettes des récipients d'expédition et sur celles de tous les ampoules doivent être observées. Ne pas utiliser d'éléments au-delà de leur date d'échéance.
- Si vous utilisez des équipements automatisés est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le kit a été correctement validées.
- Un lavage incomplet ou peu soigné et une aspiration insuffisante du liquide dans les puits des tests ELISA peuvent provoquer un manque de précision et/ou un arrière-plan élevé.
- Il est important de maintenir constants les temps de réaction dans chaque puits afin d'obtenir les résultats susceptibles d'être répétés. Le pipetage des échantillons ne doit pas durer plus de 10 minutes afin d'éviter tout résultat incorrect. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. Si vous devez utiliser plus d'une microplaque, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse.
- L'ajout de la solution de substrat donne lieu à une réaction cinétique qui est interrompue par l'ajout de la solution de blocage. Par conséquent, il est nécessaire d'ajouter le substrat et la solution bloquante dans la séquence même afin d'éliminer toute variation temporelle pendant la réaction.
- Observer les instructions relatives à l'exécution du contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant les contrôles et/ou les groupes de sérum.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons hautement lipémiques ou hémolysés.
- Les lecteurs de microplaques mesurent dans le sens vertical. Ne pas toucher le fond des puits.

6. PROCÉDURE

6.1. Préparation des étalons (S_0….S_5)

Avant utilisation, laisser sur l'agitateur rotatif pendant au moins 5 minutes.

Les concentrations suivantes d'œstriol correspondent aux étalons :

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5
pg/mL	0	2,5	15	100	600	4000

Stables 6 mois à 2÷8 °C à compter de l'ouverture des flacons.

Pour Unites SI : pg/mL x 3,5 = pmol/L

6.2. Préparation de la solution de lavage

Avant l'usage, diluer le contenu de chaque flacon de solution de lavage concentrée et tamponnée (50x) avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 1000 mL. Pour préparer des volumes moindres, respecter le rapport de dilution de 1:50. La solution de lavage diluée est stable à 2÷8°C pendant au moins 30 jours.

6.3. Préparation du conjugué dilué

Préparer immédiatement avant l'usage.

Diluer 10 µL de Conjugué (réactif 4) à 1 mL de Tampon d'incubation (réactif 3).

Mettre à agiter délicatement sur un agitateur rotatif. Stables pendant 3 heures à température ambiante (22÷28°C).

6.4. Préparation de l'échantillon

Ce kit permet la détermination de œstriol dans les échantillons de salive.

Il est conseillé, pour le prélèvement de l'échantillon, d'utiliser les tubes des *Dispositifs de prélèvement de salive* Diametra ou des Salivette Sarstedt (RÉF. 51.1534.500).

6.4.1. Méthode et limites

Recueillir les échantillons de salive dans les temps prescrits. Pour une meilleure reproductibilité et précision, il est conseillé de prélever au moins 3 échantillons dans un intervalle de temps non inférieur à 2 heures et de constituer un pool avec ces spécimens avant de les tester.

En l'absence d'indications spécifiques aux fins du prélèvement de la salive, il est possible de recueillir les échantillons à tout moment en tenant toutefois en compte les facteurs suivants :

a) Si le prélèvement de la salive doit être effectué le matin, il faut le faire avant de se laver les dents.
b) Pendant la journée, attendre au moins une heure après avoir mangé ou bu avant de recueillir les échantillons de salive.
c) Il est très important d'obtenir un échantillon liquide – non contaminé par la nourriture, des produits cosmétiques, du sang, du chewing-gum ou d'autres matières étrangères.

6.4.2.Traitement de la salive

A) Dispositif de prélèvement de salive Diametra

Faire passer la salive à travers la paille et jusque dans l'éprouvette en verre.

1) Centrifuger l'échantillon pendant 15 minutes à 3000 t/min.
2) Le déposer à –20°C pendant au moins 1 heure.
3) Décongeler l'échantillon.
4) Centrifuger encore pendant 15 minutes à 3000 t/min.
5) L'échantillon de salive est alors près pour être testé.
6) Conserver l'échantillon à 2÷8°C pendant une semaine ou à –20°C pendant une période de temps plus longue.

B) Salivette Sarstedt (voir ifu)

6.5. Procédure

Puisqu'il faut opérer en double, préparer deux puits pour chaque point de la courbe d'étalonnage (S_0-S_5), deux pour chaque contrôle, deux pour chaque échantillon et un pour le blanc.

Réactif	Étalon/ contrôle	Échantillon	Blanc
Échantillon		**50 µL**	
Étalon S_0-S_5, Contrôle L-M	**50 µL**		
Conjugué dilué	**100 µL**	**100 µL**	
Laisser incuber 1h à température ambiante (22÷28°C). Retirer le contenu de chaque puits, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Substrat TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Laisser incuber 15 minutes à température ambiante (22÷28°C), à l'abri de la lumière.			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agiter doucement la microplaque. Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc.			

7. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Chaque laboratoire devrait analyser les échantillons dans la gamme des niveaux élevés, normaux et bas d'œstriol pour vérifier les prestations de l'analyse. Ces échantillons devraient être traités comme inconnus et les valeurs déterminées devraient être dans chaque test effectué. Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées devraient être employées pour vérifier la tendance. Le laboratoire devrait définir des limites d'acceptabilité des prestations d'analyse. Les autres paramètres qui devraient être contrôlés incluent les interceptions de 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage pour évaluer la reproductibilité. De plus, la capacité d'absorption maximale devrait être constante avec l'expérience précédente. La déviation significative par rapport aux prestations établies peut indiquer un changement non observé des états ou une dégradation expérimentale des réactifs du coffret. Des réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer le motif des variations.

7.1. Interprétation des résultats

Si un ordinateur a été utilisé pour calculer les résultats, il faut impérativement que les valeurs des calibrateurs tombent dans les 10% des concentrations assignées.

8. RÉSULTATS

8.1. Extinction moyenne

Calculer l'extinction moyenne (Em) de chaque point de la courbe d'étalonnage (S_0–S_5) et de chaque échantillon.

8.2. Courbe d'étalonnage

Sur un graphique des valeurs d'absorbance, tracer les valeurs calculées des extinctions moyennes (Em)

de chaque étalon (S_0–S_5) en fonction des concentrations. Tracer la meilleur courbe passant par les points d'étalonnage (par ex. : logistique à quatre paramètres).

8.3. Calcul des résultats

Sur le graphique, faire une interpolation des valeurs d'absorbance relatives à chaque échantillon et en lire la concentration correspondante en pg/mL.

9. VALEURS DE RÉFÉRENCE

Du fait que les valeurs d'œstriol salive ont un rythme circadien, nous suggérons de recueillir les échantillons à la même heure (8 h A.M.).
Les valeurs suivantes peuvent servir d'indication préliminaire jusqu'à ce que chaque laboratoire établisse sa propre fourchette de valeurs normales :

Groupe	Heure	N	Fourchette +/- SD	Fourchette absolue
			(pg/mL)	(pg/mL)
Femmes	8 AM	21	0 - 21.0	0 - 32.0
Pré-ménopause	5 AM	21	0 - 6.8	0 - 8.9

Semaine de grossesse	Salive (pg/mL)
22°	(700 ± 500)
24°	(900 ± 600)
26°	(1200 ± 700)
28°	(1500 ± 800)
30°	(1800 ± 800)
32°	(2200 ± 1100)
34°	(3200 ± 1300)
36°	(4100 ± 1600)
37°	(4500 ± 1700)
38°	(5000 ± 2000)
39°	(5300 ± 2000)
40°	(5700 ± 2000)

10. PARAMÈTRES CARACTÉRISTIQUES

10.1. Précision

10.1.1. Intra-essai

La variabilité à l'intérieur du même coffret a été déterminée en répliquant (16x) la mesure de deux contrôles salivaires différents. La variabilité intra-essai est ≤ 9,7%.

10.1.2. Inter-essai

La variabilité entre coffrets différents a été déterminée en répliquant (10x) la mesure de deux sérums de contrôle différents avec des coffrets appartenant à des lots différents. La variabilité inter-essai est ≤ 13,7%.

10.2. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur un échantillon de salive enrichi avec 50 – 300 – 2000 pg/mL d'œstriol a donné une valeur moyenne (±SD) de 100,6% ± 14,6%.

10.3. Sensibilité

La concentration minimale d'œstriol mesurable qui pouvant être distinguées par l'étalon zéro est de 1,0 pg/mL avec une limite de confiance de 95%.

10.4. Spécificité

L'anticorps employé présente les réactions croisées suivantes, calculées à 50% selon Abraham :

Œstriol salive	100 %
16 épi-œstriol	10,5 %
15 α-OH-œstriol	7,0 %
Œstriol 3-sulfate	2,0 %
Œstradiol	0,1 %
17 épi-œstriol	$< 1x10^{-2}$ %
Œstriol 3α-glucoronate	$< 1x10^{-2}$ %
Œstriol 16α-glucoronate	$< 1x10^{-2}$ %
Prednisone	$< 1x10^{-2}$ %
Estrone	$< 1x10^{-4}$ %

10.5. Corrélation

Le coffret d'œstriol salive (Diametra) a été comparé à un coffret disponible en commerce. 30 échantillons de salive ont été testés. La courbe de régression est :
$y = 1,03x + 0,68$
$r^2 = 0,988$
y = Coffret Diametra Elisa pou l'œstriol salive
x = Coffret Salimetrics Elisa pou l'œstriol salive

11. DISPOSITIONS RELATIVES À L'ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Les réactifs doivent être jetés conformément aux lois en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fisher-Rasmussen W., et al Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417 -420 (1981)
2. Truran, P. L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining R.F., et al J. Clin. Endoc. Metab. 56,454 (1983)
4. Bagger P.V., et al Acta Obstet Gynec Scand 60:187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B.Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

Éd. 10/2011 **DCM026-10**

DiaMetra S.r.l. - Siège social : Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italie
Tél. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039–02–2133354
Fabricant : Via Giustozzi 35/35a – Z.I. Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italie
Tél. 0039–0762–24851
Fax 0039–0762–316197
Courriel : info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	**NOTICE D'INFORMATION**	

IT *Spiegazione dei simboli* **GB** *Explanation of symbols* **FR** *Explication des symboles* **ES** *Significado de los simbolos*

DE *Verwendete Symbole* **PT** *Explicaçao dos simbolos*

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
RÉF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesgo biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
 	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d 'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l 'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numéro de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

SUGGESTIONS POUR LA RÉSOLUTION DES PROBLÈMES / DÉPANNAGE

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique du dosage

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement aspiré)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement aspiré)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le dispositif de lavage pour microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du dispositif de lavage)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs